

武田 啓太 論文内容の要旨

主 論 文

Dielectrophoresis Concentration Method for Increased Sensitivity of the Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex

誘電泳動法を用いた結核菌濃縮法による Loop-Mediated Isothermal Amplification 法の検査感度上昇

武田 啓太, 近松 絹代, 青野 昭男, 五十嵐 ゆり子, 森重 雄太, 村瀬 良朗,
高木 明子, 山田 博之, 御手洗 聡

Journal of Bacteriology and Mycology, volume 7 issue 8, 1157, 2020

[4 ページ]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
主任指導教員：御手洗 聡 教授

緒 言

結核の蔓延を防ぐために正確かつ迅速・高感度の診断が必要である。迅速性の点では核酸増幅検査が有用であるが、感度は液体培養検査に劣る。この理由の一つとして菌量が少ない検体の前処理において菌濃縮、回収が不十分であることが挙げられる。標準的な前処理法である遠心集菌法の菌濃縮、回収効率を上回る前処理法の開発が結核菌検査の感度上昇のために必要である。

誘電泳動(Dielectrophoresis: DEP)は電極内に高周波をかけて細胞内脱分極を誘導し、菌体を補足する方法である。この手法により菌体を電極内に捕捉することで、菌濃縮が可能である。

今回、DEP 法を用いた前処理法が核酸増幅法の感度上昇に寄与できるかを *Mycobacterium tuberculosis* var. BCG (Tokyo 174 株) 培養液を用いて検討した。

対象と方法

初めに DEP 前後の検体の菌量を測定することで捕捉率を算出し、最適な DEP の条件を決定した。Optical density (OD) 530 nm で 0.10 まで培養した *M. tuberculosis* var. BCG 培養液を導電率低値(10 $\mu\text{S}/\text{cm}$)のバッファーに置換した。検体 1 mL を 0.5 mL/h の連続流で DEP チップに流入させ、容量 50 μL のチップに菌を捕捉した。DEP 前後の検体の DNA 抽出を行い、菌量を定量的 real-time PCR で 16S rRNA 遺伝子を標的とする primer (MTB-F と MTB-R) を用いて測定した。以上を 5 条件の周波数 (1, 50, 100, 150,

200 kHz) で検討し、各条件での菌捕捉率を比較した。

続いて通常法の loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法 (栄研化学) (60 μ L の検体を PURE DNA 抽出キットで DNA 抽出し、そのうちの 30 μ L で LAMP を施行) を、前述のバッファーで置換・希釈 (1/1,000, 1/2,500, 1/5,000) した *M. tuberculosis* var. BCG の検体で行った。10 回連続で陰性結果を示した最小希釈検体 (1/5,000, 理論濃度 10^3 cfu/ml) を DEP 法を用いた前処理法の検討に使用した。

前述の結果で得られた最適な条件で DEP 法を用いた前処理を行った。1 mL の検体を DEP チップ 50 μ L に検体を濃縮させ、そのうちの 30 μ L を直接 LAMP チューブに移し LAMP を施行した。

結 果

DEP 法は周波数 100 kHz において捕捉率が 73.2–84.9% と最も高かった。

従来の LAMP 法で 10 回連続陰性の結果であった 5,000 倍希釈検体において DEP 法を用いた前処理後に LAMP を施行した結果、10 回中 8 回で陽性結果が得られ、検査感度は優位に上昇した ($p=0.0007$)。

考 察

DEP 法による菌補足の有効性は菌自体の細胞分極、懸濁液の導電率、電極条件に影響される。今回は抗結核薬曝露のない状態の菌を用いた。また懸濁液の導電率はイオン交換樹脂を用いて可能な限り低い導電率のバッファーを作製した。最適な電極条件は周波数 100 kHz と決定した。

実験経過中、DEP チップへの菌の捕捉を顕微鏡下で確認していたが回収後の菌定量結果が予測値を大きく下回っていたため、菌を回収する過程での菌のロスがあると考えられた。捕捉した菌とチップの付着を防ぐため、DEP チップはウシ血清アルブミンでコーティングし、また 1% Tween 20 を含むバッファーを使用した。ピペット操作でのロスも防ぐため LAMP を施行する際は DEP で捕捉された菌を DNA 精製なく直接 LAMP チューブに移した。

今回従来法においては計算上 1 検査につき 30 コピーの *M. tuberculosis* var. BCG が含まれており LAMP における理論的な検出感度 (0.38 genomes/tube) を上回るが、10 回連続で陰性結果が得られた。実際の臨床検出感度は 10^2 – 10^3 cfu/ml と報告されており今回の理論濃度と同等であった。

一方で、DEP 法においても 10 回中 2 回で LAMP 陰性であった。定量的 real-time PCR による捕捉率の結果が示すように、DEP 法の前処理においても全ての菌を捕捉、回収できていない。特に検出限界程度に菌量が少ない検体では前処理の過程で菌をロスしてしまうと陰性結果となりうる。

DEP を用いた前処理法を臨床検体に応用することは簡単ではない。結核菌の臨床検体は粘性が強く、ヒト細胞成分等も多く含まれる喀痰が主である。喀痰検体では DEP 法に適した前処理法を新たに検討する必要がある。

今回の研究では検体濃縮法を改良することで検査感度上昇に寄与することを示した。DEP 法を用いた濃縮法は菌量が少ない検体の結核菌核酸増幅法検査感度上昇に寄与する可能性があり、この技術の活用により結核菌検査感度が更に高まることが期待される。